

明 細 書

BEST AVAILABLE COPY

セクレターゼ活性を抑制する方法

5 技術分野

本発明は、セクレターゼ活性を抑制する方法および医薬組成物に関する。具体的には、シノビオリンの発現を抑制してセクレターゼ阻害剤の感受性を促進することによりセクレターゼ活性を抑制する方法、及びシノビオリンを Herp と結合させることによりセクレターゼ活性を抑制する方法、並びに、セクレターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物に関する。

背景技術

シノビオリンは、リウマチ患者由来滑膜細胞に存在する膜タンパク質として発見された新規タンパク質である (WO02/05207)。遺伝子改変動物を用いた研究により、骨・関節の発生および関節症の発症に同因子が直接関与することが明らかとなったことから、シノビオリンは正常な骨形成又は四肢の発達に貢献する活性を有するタンパク質であると考えられる。

シノビオリンの発現は、骨・関節にとどまらず全身にユビキタスにみられるため、シノビオリンの生体内での機能を解析するためには、シノビオリンと結合する因子の探索が有力な手法となる。特に、シノビオリンの基質タンパク質を検出することは、シノビオリンが関与する細胞内シグナル伝達経路の同定に重要な手係りになると考えられる。

そこで、本発明者は、シノビオリンがどのような細胞内シグナル伝達経路に関わっているかを解明するために、シノビオリンを Bait とした Yeast Two Hybrid 法によりシノビオリンと結合する因子の探索を行なった。その結果、Herp (homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1) と呼ばれるタンパク質がシノビオリンと相互作用をもつ分子として同定された。Herp とは、1996 年に Miyata らによって血管内皮細胞のホモシステイン応答性遺伝子の産物とし

て発見されたタンパク質である (Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent Genes in Vascular Endothelial Cells Identified by Differential Display Analysis. J. Biol. Chem. 1996 Nov 22; 271(47): 29659-29665)。

- 5 その後の研究によって、Herp は、小胞体ストレスによって発現が誘導され、構造的には N 末端側に ubiquitin-like domain (UBL) をもつ膜タンパク質であることが明らかとなった (Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a New Ubiquitin-like Membrane Protein Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. J. Biol. Chem. 2000 Oct 20; 275(42): 32846-32853)。また、Herp は、家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子とされているプレセニリン (PS) と相互作用をもち β -アミロイドタンパク質 ($A\beta$) の膜内切断に関わるタンパク質分解酵素である γ -セクレターゼ (γ -secretase) の活性を上昇させるということが報告されている (Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, Strooper BD, Yanagisawa K, Komano H. J. Biol. Chem. 277(15):12915-12920)。
- 10
- 15

- アルツハイマー病は、高齢化が進む現代において高い関心が払われている疾患の一つである。その最も重要な特徴は、脳に老人斑、すなわち繊維状の β -アミロイドタンパク質 ($A\beta$) の沈着が観察されることである。そして、 β タンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が β -セクレターゼと γ -セクレターゼによって切断されることにより生じるタンパク質であり、アルツハイマー病患者では、この切り出しが増加している。
- 20

従って、セクレターゼの酵素活性を阻害する物質は、アルツハイマー病の治療薬として注目され、世界中でスクリーニングが行われている。

- 25 しかし、候補物質は幾つか得られているものの、未だにセクレターゼ阻害剤の開発は成功していない。

発明の開示

本発明は、脳神経疾患、特にアルツハイマー病を治療するために有用な薬

剤を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、セクレターゼ活性を抑制する物質に着目し、当該物質を用いると、 $A\beta$ の蓄積を抑制してアルツハイマー病を治療し得る知見を見出し、本発明を完成するに至つ

5 た。

すなわち、本発明は、以下の通りである。

(1) セクレターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物。

10 (2) セクレターゼが β -セクレターゼ又は γ -セクレターゼである(1)記載の医薬組成物。

(3) セクレターゼ活性を抑制する物質が、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質である、(1)又は(2)記載の医薬組成物。

(4) セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質が、シノビオリンの発現抑制物質である(3)記載の医薬組成物。

15 (5) シノビオリンの発現抑制物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である(4)記載の医薬組成物。

(6) シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号1に示される塩基配列を含むものである(5)記載の医薬組成物。

20 (7) siRNA が、配列番号1に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである(5)記載の医薬組成物。

(8) 一部の配列が、配列番号3～16に示す塩基配列から選ばれる少なくとも1つである(7)記載の医薬組成物。

25 (9) セクレターゼ活性を抑制する物質がシノビオリンである(1)又は(2)記載の医薬組成物。シノビオリンとしては、例えば配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

(10) 脳神経系疾患を治療するための(1)～(9)のいずれか1項に記載の医薬組成物。

(11) 脳神経系疾患がアルツハイマー病である(10)記載の医薬組成物。

(12) セクレターゼ阻害剤の感受性を促進することを特徴とする、セレク

ターゼ活性を抑制する方法。

(13) セクレターゼ阻害剤の感受性の促進が、シノビオリンの発現を抑制することによるものである、(12) 記載の方法。

5 (14) シノビオリンを Herp と結合させることを特徴とする、セクレターゼ活性を抑制する方法。

(15) Herp のシノビオリンとの結合領域が、Herp のアミノ酸配列の 161~200 番目のアミノ酸残基で示される領域である、(14) 記載の方法。

10 (16) セクレターゼが β -セクレターゼ又は γ -セクレターゼである (12) ~ (15) のいずれか 1 項に記載の方法。

図面の簡単な説明

図 1 は、シノビオリンの全長構造と bait に用いた Syno dTM 及び Syno Ring の構造を示す模式図である。

15 図 2 は、Herp の全長構造と断片化した Herp の構造を示す模式図である。

図 3 は、Flag-Syno dTM と Herp 各コンストラクトとの GST 融合タンパク質との結合実験の結果を示す図である。

図 4 は、HA/Syno と Flag/Herp との免疫沈降実験の結果を示す図である。

20 図 5 は、野生型及びシノビオリン欠損マウス胎児繊維芽細胞における γ -セクレターゼ阻害剤の効果を示す図である。

図 6 は、Pull down assay におけるシノビオリンと Herp との関係を示す図である。

図 7 は、in vivo におけるシノビオリンと Herp との結合領域を示す図である。

25 図 8 A は、MEF 細胞における Herp の発現を示す図である。

図 8 B は、Herp のユビキチン化を示す図である。

図 8 C は、Herp の解析に用いた constructs を示す図である。

図 9 は、MEF における γ -セクレターゼ活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者は、シノビオリンがアルツハイマー病の発症機序に関与する可能性に着目し、シノビオリンの発現をノックアウトした細胞において、セクレターゼ阻害剤の感受性が高まることを明らかにした。このことは、シノビオリンの発現を阻害させた状態において、セクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを意味しており、シノビオリンの欠失を介してセクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを示すものである。そして、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を用いることが、アルツハイマー病の治療につながることを実証した。

また、本発明は、シノビオリンをHerp蛋白質と結合させると、Herp蛋白質がユビキチン化されて分解され、その結果、セクレターゼ活性が低下することを見出した。

15 1. 概要

前述の通り、アルツハイマー病においては、セクレターゼ（例えば γ -セクレターゼ活性）によって APP が切り出され、 $A\beta$ が蓄積して老人斑が形成される。そこで本発明者は、セクレターゼがアルツハイマー病の発症機序に関与する点に着目し、セクレターゼ活性を抑制することによって $A\beta$ の蓄積並びに老人斑の形成を抑制するというプロセスの構築を考えた。

従って、本発明はセクレターゼ活性を抑制することにより、 $A\beta$ の蓄積を抑えることを特徴とする。そして、 $A\beta$ 蓄積を抑えることで、老人斑の形成を抑制し、アルツハイマー病の治療を行うことが可能となる。

シノビオリンは全身に発現が認められるタンパク質であり、生体において必須な機能を司ることが示されている。このため、シノビオリンの生体内での機能を解明することが求められていた。一般に、タンパク質の機能を明らかにするには、シノビオリンと結合する因子の探索が有力な手法のひとつに挙げられ、特に、シノビオリンの基質タンパク質を検出することは、シノビオリンが関与する細胞内シグナル伝達経路の同定に重要な手係りになると考

えられる。

そこで、シノビオリンがどのような細胞内シグナル伝達経路に関わっているかを解明するために、本発明者は、前述の通り、酵母内での結合実験及び GST Pull-down assay により、シノビオリンと Herp が相互作用をもつことを示した。次に細胞内での相互作用を確認するために、シノビオリンと Herp を HEK293 細胞に共発現させ免疫沈降によって観察したところ、酵母内・in vitro アッセイの結果と同様にシノビオリンと Herp の相互作用がみられた。このことは、シノビオリンが Herp と相互作用することを裏付けるものである。そして、タンパク質構造予測システムにより、シノビオリンに RING finger モチーフの存在が示された。このモチーフはタンパク質の分解に関わる E3 ユビキチン-タンパク質リガーゼに存在することが知られている。また RING finger モチーフは、E2 ユビキチン結合酵素の結合部位と考えられている。

従って、シノビオリンは、アルツハイマー病の発症機序、特に、セクレターゼ活性に関与すると考えられた。

ここで、本発明においてセクレターゼの活性を抑制するための機構として、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する場合と、シノビオリンを Herp タンパク質（以下、単に「Herp」ともいう）に結合する場合が考えられる。

前者は、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進することによりセクレターゼの活性を抑制し、 $A\beta$ の蓄積を抑えるというものであり、後者は、シノビオリンを Herp に結合させて Herp のユビキチン化を起し、Herp を分解させることにより $A\beta$ の蓄積を抑えるというものである。

以下、それぞれの態様について説明する。

25 2. セクレターゼ阻害剤の感受性の促進

本発明者は、セクレターゼ阻害剤の感受性に着目し、当該阻害剤の感受性を高めることによって $A\beta$ の蓄積並びに老人斑の形成を抑制するというプロセスの構築を考えた。そして、シノビオリンがアルツハイマー病の発症機序に関与する可能性に着目し、シノビオリンの発現をノックアウトした細胞に

- において、セクレターゼ阻害薬の感受性が高まることを明らかにした。このことは、シノビオリンの発現を阻害させた状態では、セクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを意味しており、シノビオリンの欠失を介してセクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを示すものである。そして、セクレターゼ阻害薬の感受性を促進する物質を用いることが、アルツハイマー病の治療につながることを実証した。

ここで、「セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する」とは、セクレターゼ阻害剤が有効に機能するようにその薬物効果を高めることを意味する。

(1) シノビオリン発現阻害及び活性阻害

- 10 セクレターゼ阻害剤の感受性を高めるためには、シノビオリンの発現を阻害する方法が採用される。

シノビオリンの発現阻害には、特に限定されるものではないが、例えば RNA 干渉 (RNAi) を利用することができる。シノビオリン遺伝子に対する siRNA (small interfering RNA) を設計及び合成し、これを細胞内に導入させることによって、RNAi を引き起こすことができる。

- 15 RNAi とは、dsRNA (double-strand RNA) が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制 (ノックダウン) される。

- 20 siRNA の設計は、以下の通り行なうことができる。

(a) シノビオリンをコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全て候補にすることが可能である。例えば、ヒトの場合では、GenBank Accession number AB024690 (配列番号 1) の任意の領域を候補にすることができる。

- 25 (b) 選択した領域から、AA で始まる配列を選択し、その配列の長さは 19 ~ 25 塩基、好ましくは 19 ~ 21 塩基である。その配列の GC 含量は、例えば 40 ~ 60% となるものを選択するとよい。具体的には、配列番号 1 に示される塩基配列のうち、以下の塩基配列を含む DNA を siRNA の標的配列として使用することができる。特に、(i) (配列番号 3)、(ii) (配列番号

4)、(vi) (配列番号 8)、(vii) (配列番号 9)、(viii) (配列番号 10) を標的とすることが好ましい。

(i) AA TGTCTGCATCATCTGCCGA GA (配列番号 3)

(ii) AA GCTGTGACAGATGCCATCA TG (配列番号 4)

5 (iii) AA AGCTGTGACAGATGCCATC AT (配列番号 5)

(iv) AA GAAAGCTGTGACAGATGCC AT (配列番号 6)

(v) AA GGTTCTGCTGTACATGGCC TT (配列番号 7)

(vi) AA CAAGGCTGTGTACATGCTC TA (配列番号 8)

(vii) AA ATGTTTCCACTGGCTGGCT GA (配列番号 9)

10 (viii) AA GGTGTTCTTTGGGCAACTG AG (配列番号 10)

(ix) AA CATCCACACACTGCTGGAC GC (配列番号 11)

(x) AA CACCCTGTATCCAGATGCC AC (配列番号 12)

(xi) AA GGTGCACACCTTCCCACTC TT (配列番号 13)

(xii) AA TGTTTCCACTGGCTGGCTG AG (配列番号 14)

15 (xiii) AA GAGACTGCCCTGCAACCAC AT (配列番号 15)

(xiv) AA CGTTCCTGGTACGCCGTCA CA (配列番号 16)

siRNA を細胞に導入するには、*in vitro* で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

20 また、本発明は、RNAi 効果をもたらすために shRNA を使用することもできる。shRNA とは、ショートヘアピン RNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有する RNA 分子である。

shRNA は、その一部がステムループを構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列 A とし、配列 A に対する相補鎖を配列 B とすると、配列 A、スペーサー、配列 B の順になるようにこれらの配列が一本の RNA 鎖に存在するようにし、全体で 45~60 塩基の長さとなるように設計する。配列 A は、標的となるシノビオリン遺伝子 (配列番号 1) の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではない。

く、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列 A の長さは 19～25 塩基、好ましくは 19～21 塩基である。

(2) セクレターゼ阻害活性

- 5 セクレターゼ阻害剤の感受性を評価する方法として、アルツハイマー病患者の脳での感受性測定実験は倫理上極めて困難であり、他の評価系を用いる必要がある。そこで、本発明者は、細胞にセクレターゼ阻害剤を処置し、当該細胞の増殖活性をセクレターゼ阻害の指標とした評価系を用いる。ここで、セクレターゼの種類は特に限定されるものではなく、 β -セクレターゼ、 γ -セクレターゼが挙げられる。従って、セクレターゼ阻害剤は、 β -セクレターゼ阻害剤及び γ -セクレターゼ阻害剤のいずれでもよい。セクレターゼ阻害剤としては、限定されるものではないが、例えば L-685,458 ((株)ペプチド研究所)、(3,5-Difluorophenylacetyl)-Ala-Phg-OBu^t [DAPT] ((株)ペプチド研究所)、Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe ((株)ペプチド研究所)、Z-Leu-Leu-Nle-CHO (Wako 社)などが挙げられる。
- 10 細胞の増殖活性が抑制されたときに、セクレターゼ活性が阻害されたと判断する。つまり、細胞の増殖活性がより抑制されるほど、セクレターゼ阻害剤の作用、感受性が強いことになる。細胞は、野生型のシノビオリン遺伝子をもつマウス、及び、シノビオリン遺伝子をノックアウトさせたシノビオリン欠損マウスの胎児繊維芽細胞(MEF)を用いて、シノビオリンの発現の有無
- 15 によるセクレターゼ阻害剤の感受性の変化を比較する。

上記シノビオリン欠損細胞を用いて阻害剤の効果を調べた結果、シノビオリンを欠損した細胞の方が、シノビオリンを持っている野生型の細胞に比べ細胞増殖の低下がみられた。すなわち、シノビオリンを欠失すると、セクレターゼ阻害剤の感受性が促進したことを意味する。

25 (3) 医薬組成物

本発明において作製された shRNA、siRNA は、シノビオリンの発現を抑制する物質であり、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む医薬組成物（特にアルツハイマー病などの脳神経系疾患の遺伝子治療剤）として使用することができる。

本発明の医薬組成物を脳神経系疾患の遺伝子治療剤として使用する場合は、脳（大脳、間脳、中脳、小脳）、延髄、脊髄などの中枢神経系を対象として適用される。

上記脳神経系疾患は、単独であっても、併発したものであってもよい。

- 5 本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が
- 10 挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

- また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。siRNA や shRNA を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られ
- 15 る細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。脳等に局所投与することもできる。

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えばアデノウイルスの場合の投与量は 1 日 1 回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1 週～8 週間隔で投与される。

- 20 siRNA 又は shRNA を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

3. シノビオリンと Herp との結合

- 25 上記したように、Herp は、小胞体ストレスによって発現が誘導され、構造的には N 末端側に UBL をもつ小胞体膜貫通タンパク質であり、細胞内在性の Herp はポリユビキチン化されていることが分かっている。本発明者は、この Herp に着目し、当該 Herp を分解することによって、 γ -セクレターゼ活性を抑制して A β の膜内切断を抑えることにより、A β の蓄積並びに老

人斑の形成を抑制するというプロセスの構築を考えた。

一方、上記のように、シノビオリンを Bait とした Yeast Two Hybrid 法によりシノビオリンと結合する因子の探索を行なったところ、シノビオリンと Herp が相互作用をもつことが示され、この相互作用は細胞内でも観察された。そこで、発明者らはシノビオリンを Herp に結合させることにより、
5 セクレターゼ活性を抑制する方法を検討した。

(1) シノビオリンと Herp の最小結合部位の決定

シノビオリンと Herp との最小結合部位は、Herp の各種切断断片を用いて、その断片とシノビオリンとの結合試験を行うことにより決定することができる。Herp を用いてシノビオリンとの結合実験を行うと、Herp のシノ
10 ビオリンとの最小結合部位は、ヒト Herp 遺伝子（配列番号 17）によりコードされるアミノ酸配列（配列番号 18）のうち第 161～200 番目の 40 アミノ酸残基にあたる領域である（下記配列）。

GYTPYGWLQLSWFQQIYARQYYMQYLAATAASGAFVPPPS（配列番号 19）
15

ここで、本発明において使用されるシノビオリンは、上記配列番号 1 によりコードされるアミノ酸配列（配列番号 2）を有するものであってもよく、また、当該アミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付
20 加されたアミノ酸配列であって Herp をユビキチン化により分解させる活性を有するものでもよい。本発明においては、上記欠失、置換等の変異の導入は、公知の部位特異的突然変異誘発法により行うことができる（例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（Invitrogen 社製）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super
25 Express Km 等（Takara 社製）を使用することができる。

培養細胞におけるシノビオリンとの結合に必須な Herp タンパク質領域を同定するには、以下の通り行うことができる。

ヒト Herp に関して、上記 40 アミノ酸残基の領域を欠失させた Herp(-bind)遺伝子を作製し、この遺伝子を適当なベクターに挿入して HEK293T

等の細胞に導入し、シノビオリンと強発現させると、欠失部位がシノビオリンと Herp との結合に必須の部位であるか否かが分かる。免疫沈降試験を行うためにこの Herp(-bind)の N 端に HA tag をつけて標識し、同様に、シノビオリンの標識には、FLAG tag をつけてもよい。

- 5 結果の解析は、強発現後に whole cell extract (WCE)を抽出して、タンパク質の発現を確認した上、抗 HA 抗体あるいは抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行えばよい。得られた免疫沈降産物をウェスタンブロット法で試験すると、Herp はシノビオリンと結合するが、Herp(-bind)はシノビオリンと結合しないため、Herp タンパク質上の 161 番目から 200 番目アミノ酸領域（配列番号 19）はシノビオリンとの結合に必須であることがわかる。
- 10

(2) Herp のユビキチン化による分解の確認

- Herp は、シノビオリンと結合することによりユビキチン化されて分解する。従って、Herp がシノビオリンの基質であるか否かは、Herp のポリユビキチン化により確認することができる。すなわち、HEK293T 細胞において、FLAG tag をつけ、さらにアミノ酸残基の一部を変異させた Herp 変異体を作製して、HA-Ubiquitin およびシノビオリンを発現させる。その後、細胞抽出物 (WCE)を抽出し、ウェスタンブロット法で各タンパク質の発現を確認した後、抗-HA 抗体による免疫沈降を行うことにより、Herp が細胞
- 15
- 20 内でポリユビキチン (poly-Ubiquitin ; Ub) 化されているか否かを確認する。

- Herp 野生型においては、ユビキチンだけ強発現させた場合、またはユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合に、ポリユビキチン化のバンドが観察される。また、ユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合は、ユビキチンだけ強発現させた場合よりも Herp と Herp 変異体の Ub 化バンドは弱いことから、Ub 化された Herp の分解が亢進していることが分かる。一方、Herp(-bind)ではユビキチンだけ強発現させた場合、およびユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合のいずれにおいても、ポリユビキチン化のバンドは検出されない。また、Herp からユビキチ
- 25

ン領域(UBL)を欠失させた Herp(-UBL)の場合は、ユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合の方がユビキチンだけ強発現させた場合より Herp(-UBL)の Ub 化バンドが強い。これらのことから、Herp の UBL 領域はシノビオリンとの結合やシノビオリンによる Ub 化に必須ではないが、分解に必須であることがわかる。

(3) MEF における γ -セクレターゼ活性の比較

アルツハイマー病におけるシノビオリンの関与は、シノビオリンをノックアウトした細胞（例えば MEF (syno (-/-))）を用いて、野生型細胞（例えば MEF (syno (+/+))）における γ -セクレターゼ活性と比較することにより、検討することができる。すなわち、MEF 細胞を溶解バッファーで処理して細胞溶解液とした後、反応バッファーと蛍光標識された基質を加えて酵素反応を行い、所定の励起波長、測定波長で蛍光を測定すると、MEF において γ -セクレターゼ活性の増加の有無を確認することができる。

本発明においては、シノビオリンを Herp に結合させると、Herp が分解されて γ -セクレターゼ活性を抑制することができる。なお、Herp は、FAD の原因遺伝子とされているプレセニリン (PS) と相互作用をもち、複合体を形成することにより、 γ -セクレターゼの活性を上昇させることも分かっている。従って、シノビオリンと Herp の結合体及びシノビオリンと Herp - PS 複合体との結合体を用いると、アルツハイマー病の治療につながる事が実証されている。

(4) 医薬組成物

本発明において、シノビオリンを Herp 又は Herp - PS 複合体に結合させると、ユビキチン化により Herp の分解を引き起こし、ひいてはアルツハイマー病の原因となる A β タンパク質の蓄積を抑制することから、シノビオリンは、セクレターゼ活性の抑制に関与する物質であり、アルツハイマー病などの脳神経系疾患を治療するための医薬組成物として使用することができる。

本発明の医薬組成物を脳神経系疾患の治療剤として使用する場合は、脳

(大脳、間脳、中脳、小脳)、延髄、脊髄などの中枢神経系を対象として適用される。本発明の医薬組成物は、そのまま患部に適用することもできるし、あらゆる公知の方法、例えば、静脈、筋肉、腹腔内又は皮下等の注射、あるいは鼻腔、口腔又は肺からの吸入、経口投与、カテーテルなどを用いた血管内投与等により対象となる細胞や臓器に導入することもできる。

また、例えば凍結などの方法により扱いやすくした後、そのまま若しくは賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤等公知の薬学的に許容される担体、公知の添加剤（緩衝剤、等張化剤、キレート剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等が含まれる。）などと混合することができる。

10 本発明の医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、シロップ剤等の経口投与剤、注射剤、外用剤、坐剤、点眼剤等の非経口投与剤などの形態に応じて、経口投与又は非経口投与することができる。好ましくは、筋肉、腹腔等への局部注射、静脈への注射等が例示される。

投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象、患者の年齢、体重、性別、症状その他の条件により適宜選択されるが、一日の維持量として成人 15 1kg あたり約 0.1mg～約 100mg であり、好ましくは 0.1mg～10mg、より好ましくは 0.1mg～1.0mg である。シノビオリンは、1日1回投与することもでき、数回に分けて投与することもできる。

本発明の医薬組成物（シノビオリン）を生体内で遺伝子発現させて使用する 20 場合（遺伝子治療の場合）は、前記遺伝子治療剤について述べたのと同様に、シノビオリン遺伝子を注射により直接投与する方法のほか、シノビオリン遺伝子が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、 25 レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

ここで、本発明において使用されるシノビオリン遺伝子は、上記配列番号 1 に示す塩基配列を有するものに限定されるものではなく、当該塩基配列に相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、

Herp との結合活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も含まれる。

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が 100～500 mM、好ましくは 150～300 mM であり、温度が 50～70℃、好ましくは 55～65℃の条件を意味する。

- 5 また、シノビオリン遺伝子をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。上記遺伝子を保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。脳等に局所投与することもできる。

- シノビオリン遺伝子の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、
10 剤型によって異なるが、例えばアデノウイルスの場合の投与量は 1 日 1 回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1 週～8 週間隔で投与される。

シノビオリン遺伝子を目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クローンテック社）を用いることもできる。

15

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕

- 本実施例は、Yeast Two Hybrid systemによるHerpのスクリーニングの実
20 施例である。

Yeast Two Hybrid system は、MATCHMAKER system (CLONTECH) を用い、酵母形質転換法(Pro.Natl.Aca.Sci.USA,88:9578-9582,1991)で行った。

- シノビオリンcDNAの706bp（236番目のアミノ酸）から1851bp(617番目の
25 アミノ酸)又は805bp(269番目のアミノ酸)から1260bp(420番目のアミノ酸)の末端をEcoR I/Xho IとしpGBT9 vectorのEcoR I/Xho Iサイトに挿入した（以下、シノビオリンの706bp（236番目のアミノ酸）から1851bp(617番目のアミノ酸)をSyno dTM、805bp(269番目のアミノ酸)から1260bp(420番目のアミノ酸)をSyno Ringという。図1参照。）。なお、図1において「bp」は塩基

配列の位置番号を示している。

Herp のスクリーニングに用いるライブラリーはヒト軟骨由来の cDNA を pACT2 vector に挿入したものをを用いた(pACT2-Y)。42℃、15 分のヒート
5 ショックの後、酵母株 Y190 に pGBT9-Syno dTM 又は pGBT9-Syno Ring(2.0 μ g)、pACT2-Y(20 μ g)を導入した。

各ベクターを導入した Y190 を Tris-EDTA(pH7.5)緩衝液(TE)で洗浄後、SD-Trp-Leu-His プレートに TE で希釈した Y190 の溶液を広げ、30℃で 10
10 日培養した。現れてきたコロニーに対し、0.5mg/ml の X-gal を基質とする β ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行い、陽性クローンを検出した。

陽性クローンを SD-Leu-His 培地にて 30℃で 10 日震盪培養し、アルカリ-SDS 法(Methods Enzymol.,194:169-182,1991)にてプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA を大腸菌株 HB101 に形質転換し、M9
15 プレート(-Leu)に広げ、37℃で 2 日培養した。現れてきたコロニーを 20 μ g/ml LB 培地で 37℃、16 時間震盪培養しアルカリ-SDS 法によってプラスミド DNA を抽出した。

抽出したプラスミド DNA に挿入されているヒト軟骨由来の cDNA 断片の解析には BigDye Terminator Cycle Sequencing system (Applied Biosystems) を用いた。シークエンスの解析結果を BLAST により検索した結果、ホモシステイン誘導性の小胞体タンパク質 homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1 (ACCESSION No. BC032673 以下、Herp と略す)を得た。
20

〔実施例 2〕

25 本実施例は、in vitroにおいてシノビオリンとHerpを結合させた実施例である。

TNT-coupled Translation System (Promega) 及びシノビオリンの 706bp から 1854bp を挿入した pcDNA3-Flag-Syno dTM を作製した。これを用いて in vitro translation を行い、(i) Flag-Syno dTM 融合タンパク質、

(ii) Herp の GST 融合タンパク質、(iii) 断片化した Herp の GST 融合タンパク質を作製した (図 2)。図 2 において、「a.a.」はアミノ酸配列の位置番号を示し、UBQ はユビキチンドメインを示している。

これらの融合タンパク質及び(iv)対照としての GST タンパク質を 20mM
5 Hepes(pH7.9), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% Tween, 5% Glycerol, 1mM DTT, 0.2mM NaVO₄, 5mM NaF, 1mM PMSF を含む結合バッファーに加え、4°C で 16 時間反応させた。その反応物について SDS-PAGE を行い、イメージアナライザー (BAS2000, Fujix) で放射活性を検出した。

その結果、Herp-M と Herp-C の GST 融合タンパク質と [³⁵S] pcDNA3-
10 Flag-Syno dTM の結合が観察された。

コントロールである GST と pcDNA3-Flag-Syno dTM との結合は認められなかった (図 3)。この結果から、シノビオリンと Herp は、タンパク質の相互作用により結合することが推測された。

15 [実施例 3]

本実施例は、in vivo においてシノビオリンと Herp を結合させた実施例である。

HEK293 細胞を 10cm dish に 2 X 10⁶ cells 蒔き、24 時間培養後、シノビオリンの 1bp から 1854bp を挿入した pcDNA3-HA/Syno、及び Herp の
20 1bp から 1176bp を挿入した pcDNA3-Flag/Herp を、各 3 μg ずつ遺伝子導入した。遺伝子導入して 24 時間後細胞を回収し、Lysis buffer に溶解後、抗 HA 及び抗 Flag 抗体で 4°C 下終夜免疫沈降を行った。遠心操作により結合タンパク質と遊離タンパク質を分け、ウェスタンブロット法により検出した。検出には抗 HA 及び抗 Flag 抗体を用いた。

25 その結果、シノビオリン及び Herp を共発現した細胞では、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降後、抗 Flag 抗体で検出すると Flag-Herp のバンドを確認することができた。また、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 HA 抗体で検出すると HA-シノビオリンのバンドを確認することができた。この結果より、in vitro 条件下と同様にシノビオリンと Herp は、タンパク質の相

相互作用により結合することが推測された（図 4）。なお、図 4 において、IP は免疫沈降に用いた抗体の種類を示し、WB はウェスタンブロットに用いた抗体の種類を示す。*印は IgG HC (IgG heavy chain、重鎖) を示している。

5

〔実施例 4〕

本実施例は、シノビオリン欠失細胞での細胞増殖活性における γ -セクレターゼ阻害剤の影響を確認した実施例である。

シノビオリン遺伝子導入マウス（野生型マウス）及びシノビオリン遺伝子欠損マウスから得られた胎児繊維芽細胞（MEFs）を、96well plate に 1×10^3 cells/well になるようにまき、終夜培養した。培養後の細胞に γ -セクレターゼ阻害剤（Z-Leu-Leu-Nle-CHO、Wako）を処理し、24 時間培養した後、Alamer Blue を加え、2 時間後に吸光度を測定した。

結果を図 5 に示す。なお、図 5 において、黒いカラムは野生型マウス由来の細胞、白いカラムはシノビオリン欠損マウス由来の細胞を示している。シノビオリン欠損マウス由来の細胞では、 γ -セクレターゼ阻害剤の作用が野生型マウス由来の細胞よりも顕著である。なお、Tuni. はツニカマイシンを表している。

図 5 より、シノビオリン欠損マウス胎児繊維芽細胞(Syno^{-/-})において γ -セクレターゼ活性を阻害したものはシノビオリンマウス胎児繊維芽細胞(Syno^{+/+})と比較して細胞の増殖活性の抑制がみられた。このことは、シノビオリンの有無で細胞の γ -セクレターゼ阻害剤への感受性が変化すること、すなわち、シノビオリンを欠失すると γ -セクレターゼ阻害剤の感受性が促進されるということを意味する。そのため、シノビオリンの抑制剤はアルツハイマー病の病理過程の第 1 段階とされている A β の蓄積を調節することにより、アルツハイマー病の治療薬として利用することが出来る。

〔実施例 5〕

本実施例は、シノビオリンに対する Herp の最小結合部位を決定したもの

である。

すなわち、シノビオリンを Bait とした Yeast Two Hybrid Screening により、ヒト軟骨 cDNA ライブラリーより得られたシノビオリンの基質候補分子 Herp に関して、シノビオリンとの最小結合部位を決定した。すなわち、

- 5 pcDNA3 Flag 又は HA ベクターに組み込まれた Herp を鋳型とした PCR によって、断片化したインサートの作成を行った。GST Pull Down assay を目的として、シノビオリン及び Herp を断片化し、pGEX 及び pcDNA3 ベクターに挿入した。

- 10 その結果、Herp のアミノ酸配列番号 161-200 と syno dTM が結合することが予想された (図 6)。

[実施例 6]

本実施例は、培養細胞におけるシノビオリンとの結合に必須な Herp タンパク質領域を同定したものである。

- 15 実施例 5 の結果より、シノビオリンと Herp の結合に必要な Herp 側のアミノ酸は 161-200 の 40 アミノ酸と考えることができる (図 6)。そこで、Herp の 161-200 の 40 アミノ酸を除いた Herp(-bind) を作製し、細胞内でのシノビオリンとの結合実験を行なった。

- 20 Herp はシノビオリンと結合することが明らかにされ、Herp タンパク質上シノビオリンと結合する領域 (アミノ酸配列の 161~200 の間) の同定も進んでいた。本実施例では、この領域を欠失した場合に、Herp とシノビオリンとの結合にどのような影響が及ぶのかについて、以下のように実験を行った。

- Herp 遺伝子上、161 番目から 200 番目までのアミノ酸をコードする部分を、PCR 法により欠失させ、Herp(-bind) 遺伝子を作製した (図 7 上)。そして、
25 この遺伝子の N 端に HA tag を付け、pcDNA3 vector に挿入した。続いて、HEK293T 細胞において、HA tag 付き Herp、Herp(-bind)、空 vector をそれぞれ FLAG tag 付きシノビオリンと強発現させた。24 時間後に whole cell extract (WCE) を抽出し、各タンパク質の発現を確認した上、抗 HA 抗体或は抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。

150 mM NaClを含むwash bufferで洗浄した免疫沈降産物でウェスタンブロット法を行った結果、Herpはシノビオリンと結合するが、Herp(-bind)はシノビオリンと結合しないことが分かった（図7下）。従って、Herpタンパク質上の161番目から200番目アミノ酸領域はシノビオリンとの結合に必須であることが明らかになった。

〔実施例7〕

本実施例は、Herpはシノビオリンの基質であることを検討したものである。

10 実験手法は以下の通りである。

Herpはyeast two-hybrid, GST-pull down実験により、細胞内においてシノビオリンと結合することが明らかになっている。HerpはN端にUBLを持つ小胞体膜貫通蛋白質であり、細胞に発現させたHerpはポリユビキチン化されていることが報告されている（Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-responsive Genes in Vascular Endothelial Cells Identified by Differential Display Analysis. J. Biol. Chem. 1996 Nov 22; 271(47): 29659-29665）。また、シノビオリン (-/-) MEF細胞中のHerp蛋白質は、シノビオリン (+/+) MEF細胞中に比べ、蓄積されていることも観察された（図8A）。このため、Herpはシノビオリンの基質である可能性が十分考えられた。

20 なお、上記実験において、抗Herp(N)抗体の認識部位として、Herpのアミノ酸配列の第37～50番目の領域であるLKAHLRVYPERPR（配列番号20）からなるアミノ酸配列を用いている。

しかし、in vitroのユビキチン反応系においては、HerpのGST融合タンパク質であるGST-Herpに関しては、シノビオリン非存在下でもユビキチン化されるバンドが観察された。

そこで、本実施例では、Herpがシノビオリンの基質となり、自己ユビキチン化されるのかについて検討した。

HEK293T細胞において、FLAG tag付き各種Herp変異constructs（図8C）を用いて、それぞれHA-Ubiquitin/pcDNA3またはシノビオリン/pcDNA3と

強発現させた。

強発現から24時間後、細胞からwhole cell extract(WCE)を抽出し、ウェスタンブロット法で各蛋白質の発現を確認した。そして、抗HA抗体による免疫沈降を行い、抗FLAG抗体によるHerp蛋白質のポリユビキチン化の有無を検

5 討した。

Herp野生型においては、ユビキチンだけ強発現させた場合、またはユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合、ポリユビキチン化のバンドが観察された。また、ユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合は、ユビキチンだけ強発現させた場合よりもHerpのUb化バンドは弱くなった

10 ことから、Ub化されたHerpの分解が亢進していると思われる。これに対し、Herp(-bind)ではユビキチンだけ強発現させた場合、またはユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合のいずれも、ポリユビキチン化のバンドが検出されなかった。また、Herp(-UBL)の場合、ユビキチンとシノビオリンを同時に強発現させた場合の方がユビキチンだけ強発現させた場合よりHerp
15 (-UBL)のUb化バンドが強かった (図 8 B)。従って、HerpのUBL領域はシノビオリンとの結合やシノビオリンによるUb化に必須ではないが、分解に必須であると考えられた。

[実施例 8]

20 本実施例は、アルツハイマー病でのシノビオリンの関与を検討するため、MEF (syno(+/+))及び(-/-)) における γ -セクレターゼ活性の比較を行なったものである。

MEF (syno(+/+))及び(-/-)) を溶解バッファーで処理して細胞溶解液とした後、反応バッファーと、蛍光標識された基質である合成 APP を加えて、
25 37℃、2時間で酵素反応を行なった。測定は、励起波長 360nm、測定波長 465nm で蛍光を測定することにより行なった。

その結果、syno(+/+))に比べて、syno (-/-)の MEF において、 γ -セクレターゼ活性の増加が見られた (図 9)。

産業上の利用可能性

本発明により、セクレターゼ活性を抑制する方法が提供される。また、本発明により、セクレターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病などの脳神経系疾患治療薬と

5 して有用である。

請 求 の 範 囲

1. セクレターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物。
2. セクレターゼが β -セクレターゼ又は γ -セクレターゼである請求項 1
5 記載の医薬組成物。
3. セクレターゼ活性を抑制する物質が、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質である、請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。
4. セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質が、シノビオリンの発現抑制物質である請求項 3 記載の医薬組成物。
- 10 5. シノビオリンの発現抑制物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 4 記載の医薬組成物。
6. シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 に示される塩基配列を含むものである請求項 5 記載の医薬組成物。
7. siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 5 記載の医薬組成物。
15
8. 一部の配列が、配列番号 3～16 に示す塩基配列から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 7 記載の医薬組成物。
9. セクレターゼ活性を抑制する物質がシノビオリンである請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。
- 20 10. 脳神経系疾患を治療するための請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。
11. 脳神経系疾患がアルツハイマー病である請求項 10 記載の医薬組成物。
12. セクレターゼ阻害剤の感受性を促進することを特徴とする、セクレターゼ活性を抑制する方法。
- 25 13. セクレターゼ阻害剤の感受性の促進が、シノビオリンの発現を抑制することによるものである、請求項 12 記載の方法。
14. シノビオリンを Herp と結合させることを特徴とする、セクレターゼ活性を抑制する方法。
15. Herp のシノビオリンとの結合領域が、Herp のアミノ酸配列の 161

～200 番目のアミノ酸残基で示される領域である、請求項 1 4 記載の方法。

1 6 . セクレターゼが β -セクレターゼ又は γ -セクレターゼである請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

5

図 1

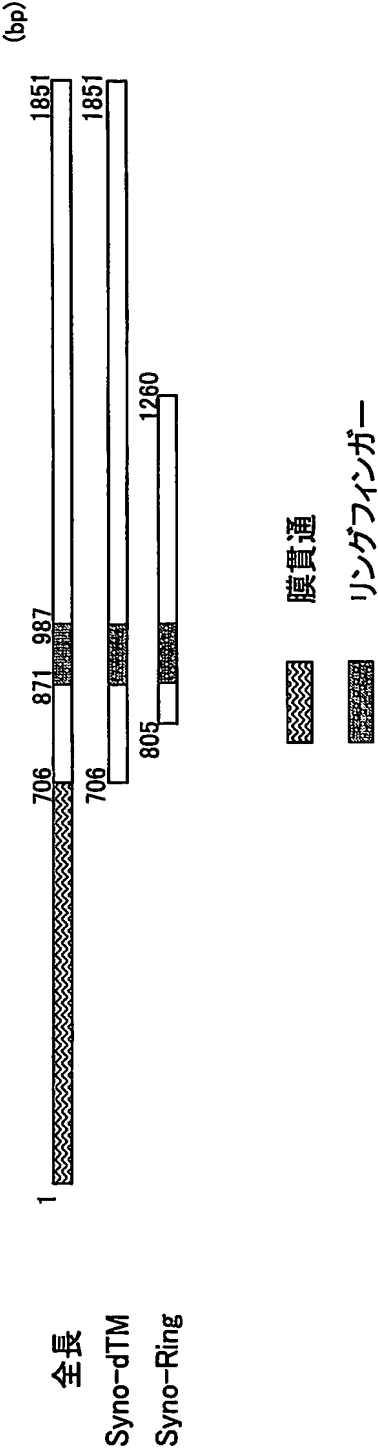


図2

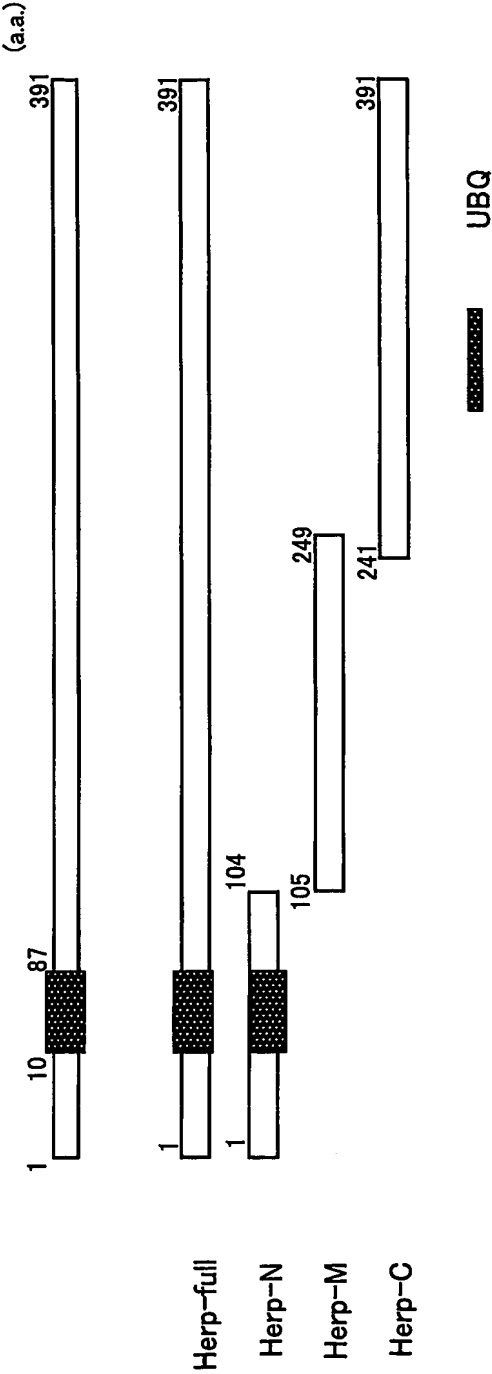


図3

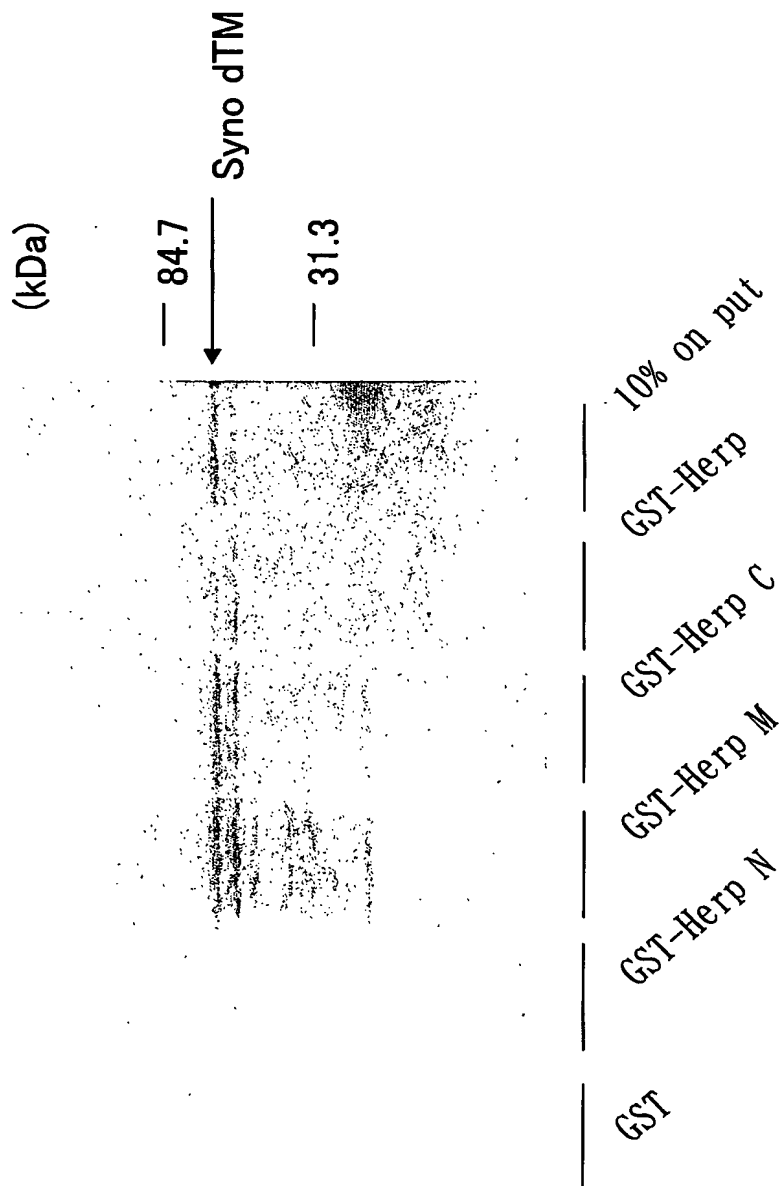


図4

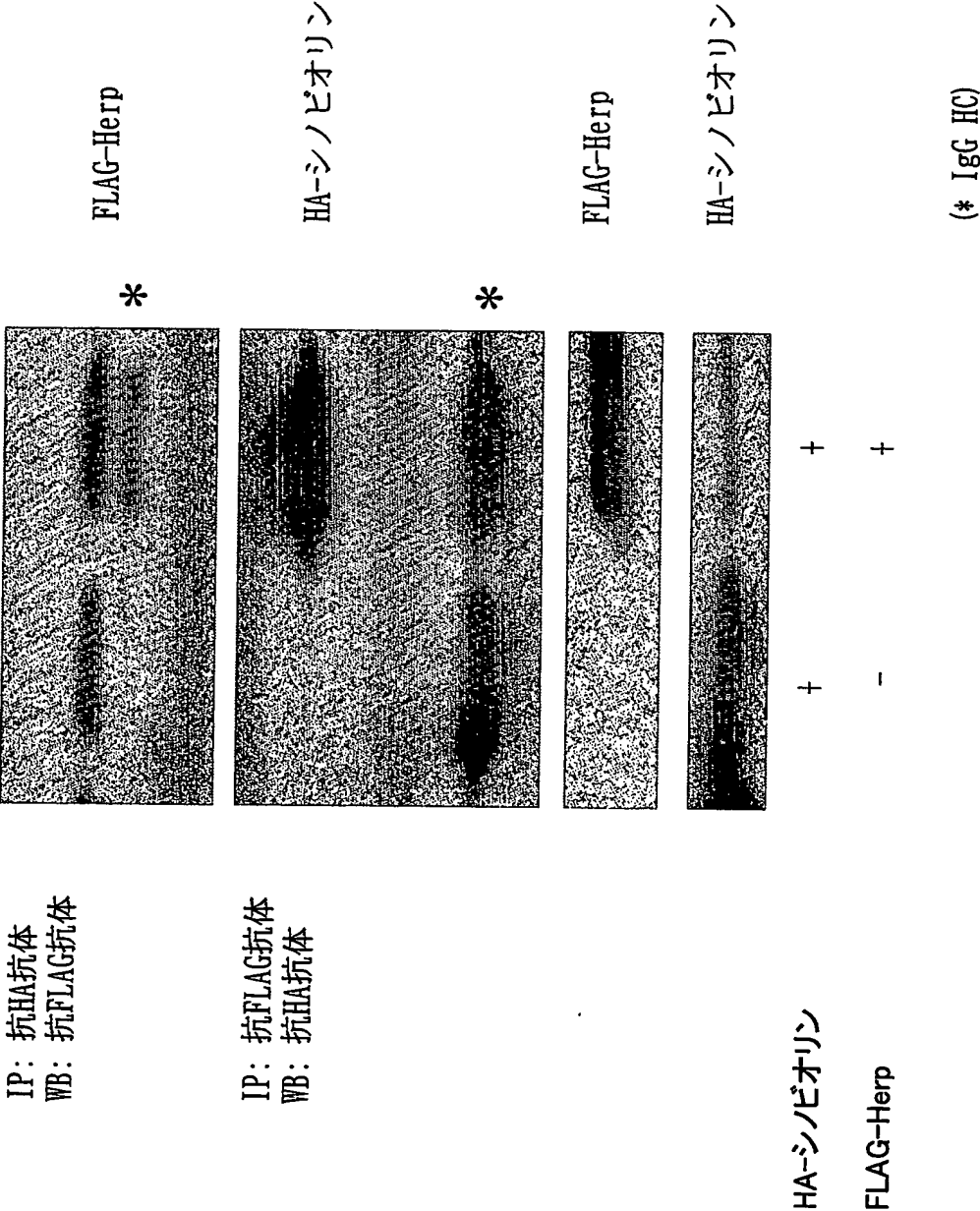


図5

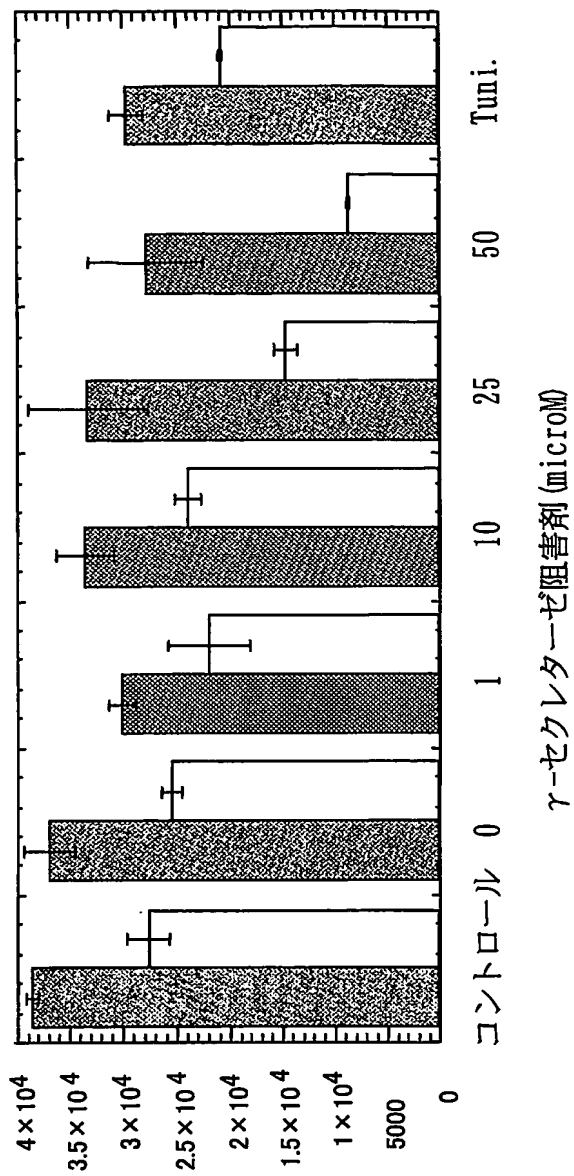


図6

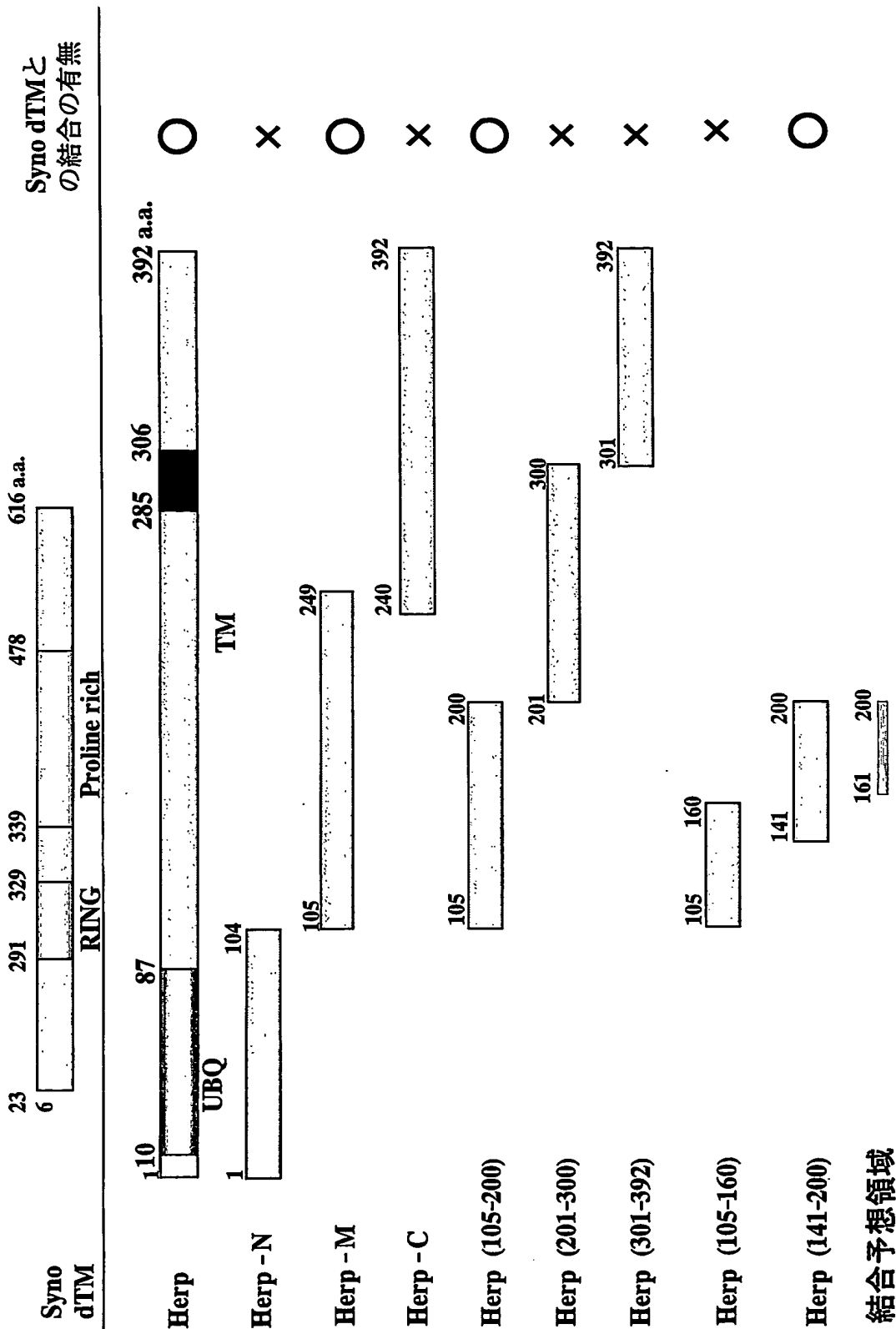


図7

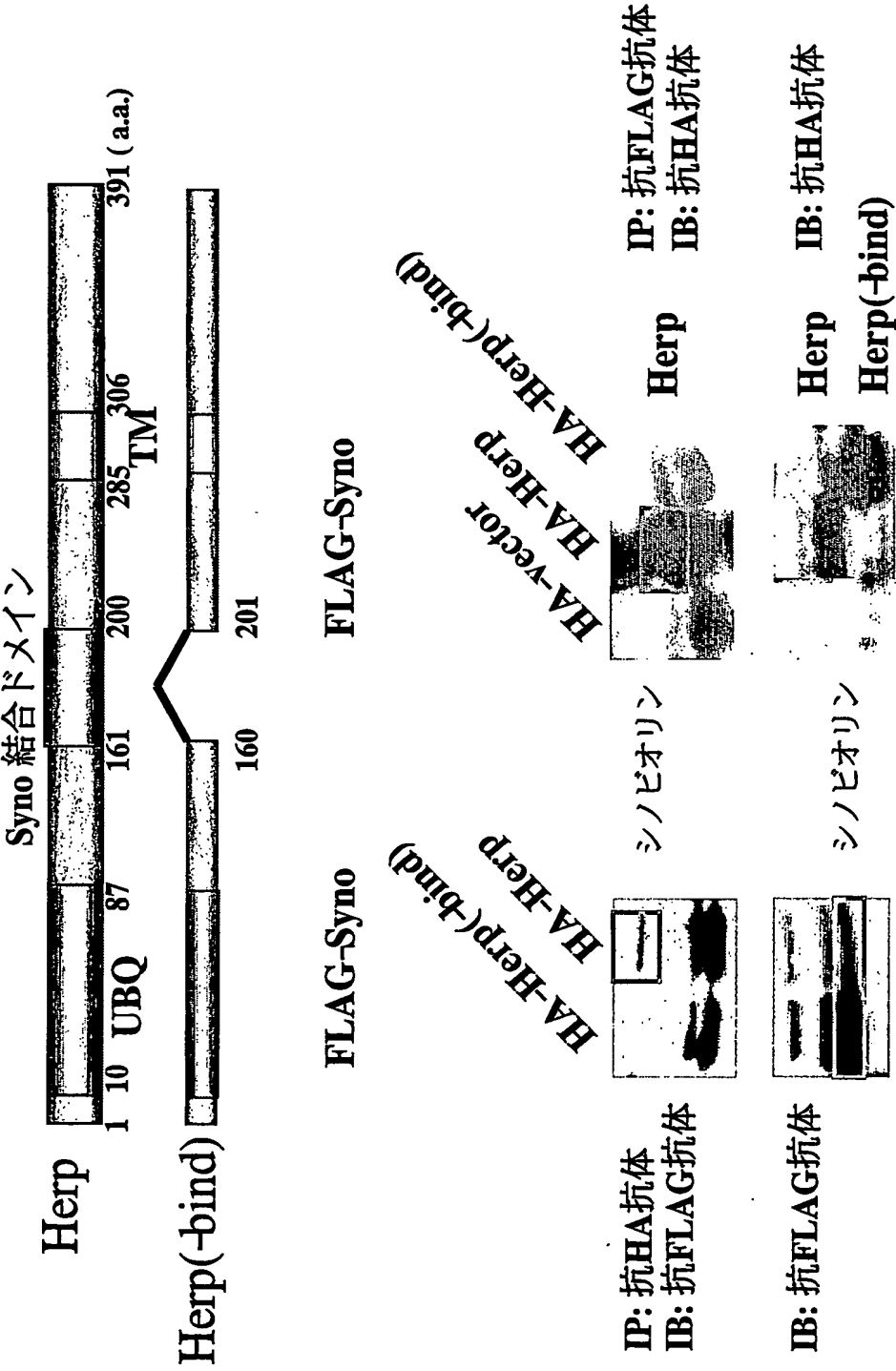
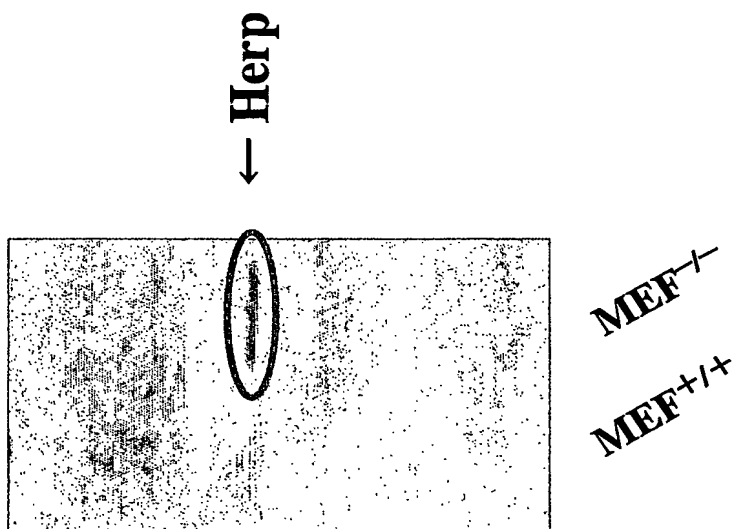


図8A



IB: 抗Herp(N)抗体

抗Herp(N)抗体の認識部位
³⁷LKAHLSRVYPER⁵⁰PR

図8B

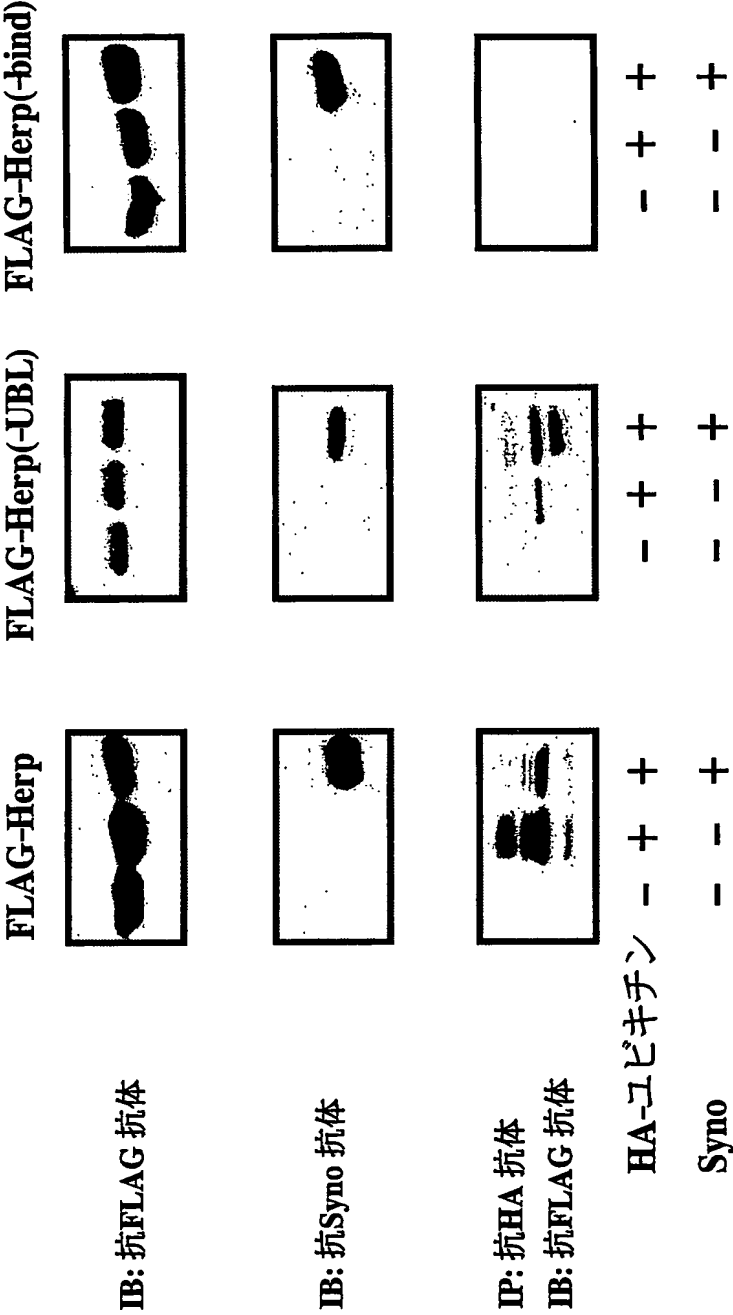


図8C

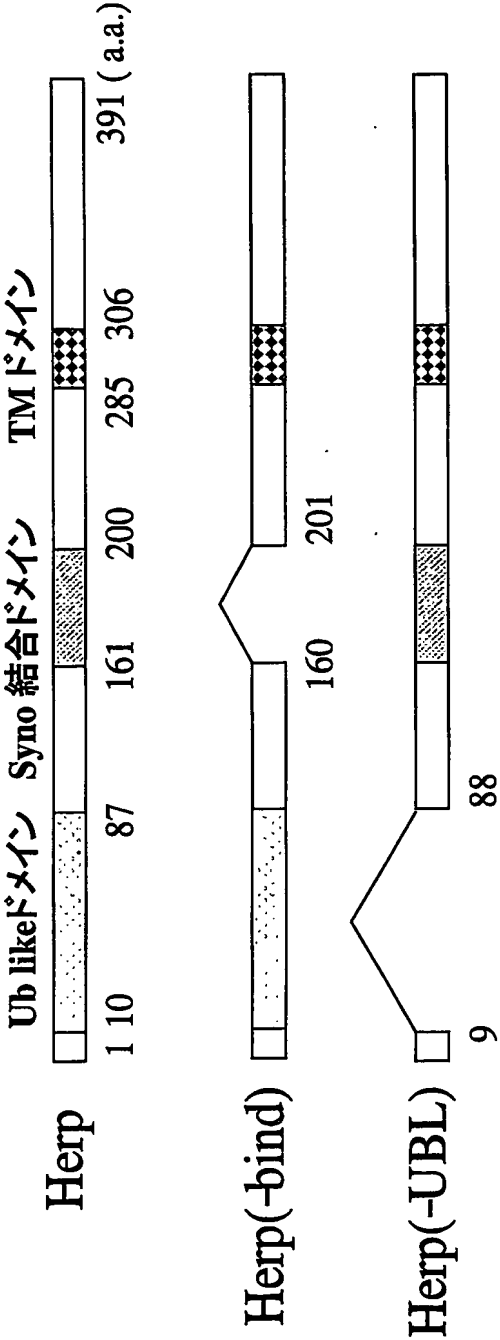
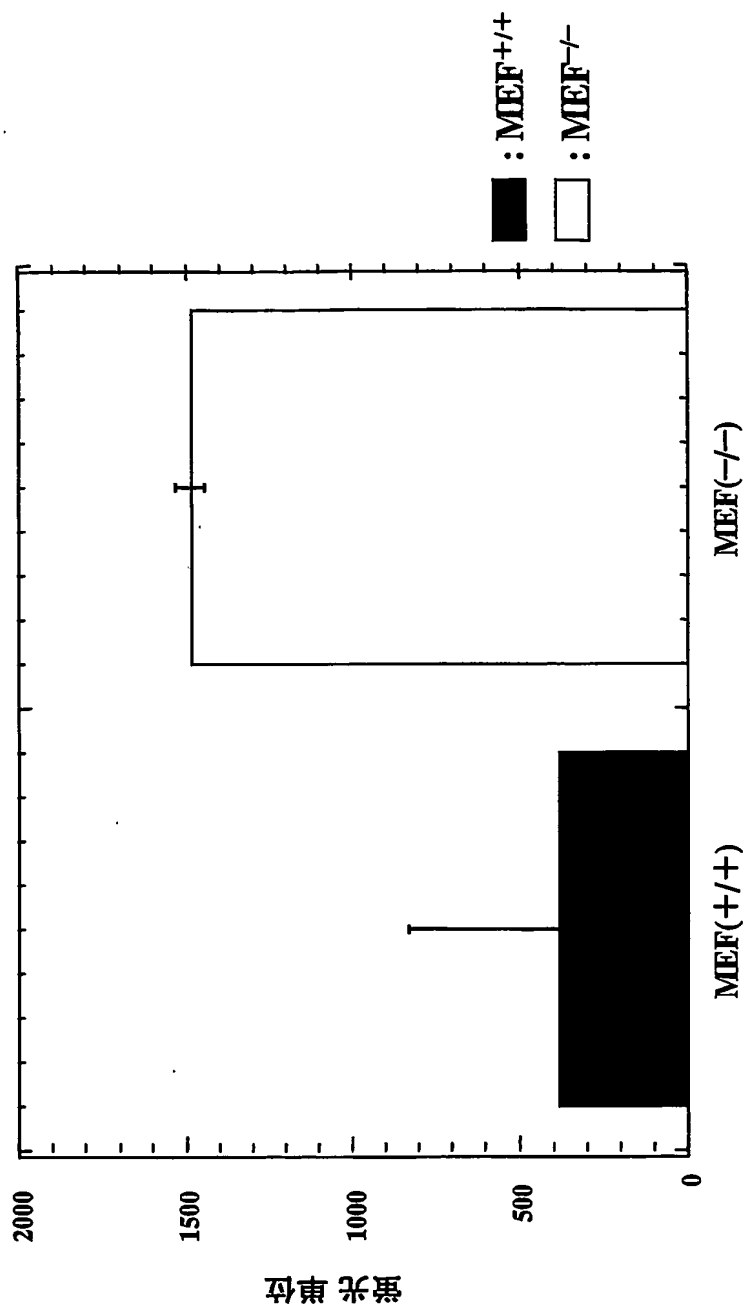


図9



SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> A method of inhibiting secretase activity

<130> P03-0112PCT

<150> JP2003-359704

<151> 2003-10-20

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (403).. (2256)

<223>

<400> 1

gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttgttgg 60

ttgattgtag atatagggtc ctccttgca aggttaattag gctccttaaa ttacctgtaa 120

gattttcttg ccacagcatc cattctgggt aggctgggtga tcttctgagt agtgatagat 180

tggttgggtg tgaggtttac aggtgttccc tctcttact cctgggtgtg gctacaatca 240

ggtggcgtct agagcagcat gggacaggtg ggtaaggga gtcttctcat tatgcagaag 300

tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga 360

gcgggctcgc ggcgctgggt tcctggcttc cgggccaggg ca atg ttc cgc acg 414
Met Phe Arg Thr
1

gca gtg atg atg gcg gcc agc ctg gcg ctg acc ggg gct gtg gtg gct 462
Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ala Val Val Ala
5 10 15 20

cac gcc tac tac ctc aaa cac cag ttc tac ccc act gtg gtg tac ctg 510
His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr Val Val Tyr Leu
25 30 35

acc aag tcc agc ccc agc atg gca gtc ctg tac atc cag gcc ttt gtc 558
Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile Gln Ala Phe Val
40 45 50

ctt gtc ttc ctt ctg ggc aag gtg atg ggc aag gtg ttc ttt ggg caa 606
Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val Phe Phe Gly Gln
55 60 65

ctg agg gca gca gag atg gag cac ctt ctg gaa cgt tcc tgg tac gcc 654
Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg Ser Trp Tyr Ala
70 75 80

gtc aca gag act tgt ctg gcc ttc acc gtt ttt cgg gat gac ttc agc 702
Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg Asp Asp Phe Ser
85 90 95 100

ccc cgc ttt gtt gca ctc ttc act ctt ctt ctc ttc ctc aaa tgt ttc 750
Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Cys Phe
105 110 115

cac tgg ctg gct gag gac cgt gtg gac ttt atg gaa cgc agc ccc aac 798
His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu Arg Ser Pro Asn
120 125 130

atc tcc tgg ctc ttt cac tgc cgc att gtc tct ctt atg ttc ctc ctg 846
Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu Met Phe Leu Leu

135	140	145	
ggc atc ctg gac ttc ctc ttc gtc agc cac gcc tat cac agc atc ctg			894
Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr His Ser Ile Leu			
150	155	160	
acc cgt ggg gcc tct gtg cag ctg gtg ttt ggc ttt gag tat gcc atc			942
Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe Glu Tyr Ala Ile			
165	170	175	180
ctg atg acg atg gtg ctc acc atc ttc atc aag tat gtg ctg cac tcc			990
Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr Val Leu His Ser			
185	190	195	
gtg gac ctc cag agt gag aac ccc tgg gac aac aag gct gtg tac atg			1038
Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys Ala Val Tyr Met			
200	205	210	
ctc tac aca gag ctg ttt aca ggc ttc atc aag gtt ctg ctg tac atg			1086
Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val Leu Leu Tyr Met			
215	220	225	
gcc ttc atg acc atc atg atc aag gtg cac acc ttc cca ctc ttt gcc			1134
Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe Pro Leu Phe Ala			
230	235	240	
atc cgg ccc atg tac ctg gcc atg aga cag ttc aag aaa gct gtg aca			1182
Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys Lys Ala Val Thr			
245	250	255	260
gat gcc atc atg tct cgc cga gcc atc cgc aac atg aac acc ctg tat			1230
Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met Asn Thr Leu Tyr			
265	270	275	
cca gat gcc acc cca gag gag ctc cag gca atg gac aat gtc tgc atc			1278
Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp Asn Val Cys Ile			
280	285	290	

atc tgc cga gaa gag atg gtg act ggt gcc aag aga ctg ccc tgc aac	1326
Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg Leu Pro Cys Asn	
295 300 305	
cac att ttc cat acc agc tgc ctg cgc tcc tgg ttc cag cgg cag cag	1374
His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe Gln Arg Gln Gln	
310 315 320	
acc tgc ccc acc tgc cgt atg gat gtc ctt cgt gca tgc ctg cca gcg	1422
Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala Ser Leu Pro Ala	
325 330 335 340	
cag tca cca cca ccc ccg gag cct gcg gat cag ggg cca ccc cct gcc	1470
Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly Pro Pro Pro Ala	
345 350 355	
ccc cac ccc cca cca ctc ttg cct cag ccc ccc aac ttc ccc cag ggc	1518
Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn Phe Pro Gln Gly	
360 365 370	
ctc ctg cct cct ttt cct cca ggc atg ttc cca ctg tgg ccc ccc atg	1566
Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu Trp Pro Pro Met	
375 380 385	
ggc ccc ttt cca cct gtc ccg cct ccc ccc agc tca gga gag gct gtg	1614
Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Gly Glu Ala Val	
390 395 400	
gct cct cca tcc acc agt gca gca gcc ctt tct cgg ccc agt gga gca	1662
Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Ser Gly Ala	
405 410 415 420	
gct aca acc aca gct gct ggc acc agt gct act gct gct tct gcc aca	1710
Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ala Thr	
425 430 435	
gca tct ggc cca ggc tct ggc tct gcc cca gag gct ggc cct gcc cct	1758
Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala Gly Pro Ala Pro	

440	445	450	
ggt ttc ccc ttc cct cct ccc tgg atg ggt atg ccc ctg cct cca ccc			1806
Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro Leu Pro Pro Pro			
455	460	465	
ttt gcc ttc ccc cca atg cct gtg ccc cct gcg ggc ttt gct ggg ctg			1854
Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly Phe Ala Gly Leu			
470	475	480	
acc cca gag gag cta cga gct ctg gag ggc cat gag cgg cag cac ctg			1902
Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu Arg Gln His Leu			
485	490	495	500
gag gcc cgg ctg cag agc ctg cgt aac atc cac aca ctg ctg gac gcc			1950
Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr Leu Leu Asp Ala			
505	510	515	
gcc atg ctg cag atc aac cag tac ctc acc gtg ctg gcc tcc ttg ggg			1998
Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu Ala Ser Leu Gly			
520	525	530	
ccc ccc cgg cct gcc act tca gtc aac tcc act gag ggg act gcc act			2046
Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu Gly Thr Ala Thr			
535	540	545	
aca gtt gtt gct gct gcc tcc tcc acc agc atc cct agc tca gag gcc			2094
Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro Ser Ser Glu Ala			
550	555	560	
acg acc cca acc cca gga gcc tcc cca cca gcc cct gaa atg gaa agg			2142
Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro Glu Met Glu Arg			
565	570	575	580
cct cca gct cct gag tca gtg ggc aca gag gag atg cct gag gat gga			2190
Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met Pro Glu Asp Gly			
585	590	595	

gag ccc gat gca gca gag ctc cgc cgg cgc cgc ctg cag aag ctg gag	2238
Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu Gln Lys Leu Glu	
600 605 610	
tct cct gtt gcc cac tga cactgcccc gcccagcccc agcctctgct	2286
Ser Pro Val Ala His	
615	
cttttgagca gccctcgctg gaacatgtcc tgccaccaag tgccagctcc ctctctgtct	2346
gcaccaggga gtagtacccc cagctctgag aaagaggcgg catccccctag gccaagtgga	2406
aagaggctgg gggtccatt tgactccagt cccaggcagc catggggatc tcgggtcagt	2466
tccagccttc ctctccaact cticagccct gtgttctgct ggggccatga aggcagaagg	2526
tttagcctct gagaagccct ctcttcccc cacccttct caggagaagg ggctgcccct	2586
ccaagcccta ctgtatgtg cggagtcaca ctgcagtgcc gaacagtatt agctcccgtt	2646
cccaagtgtg gactccagag gggctggagg caagctatga acttgctcgc tggcccaccc	2706
ctaagactgg taccatttc cttttcttac cctgatctcc ccagaagcct cttgtggagg	2766
tggctgtgcc ccctatgcc tgtggcattt ctgcgtctta ctggcaacca cacaactcag	2826
ggaaaggaat gccctgggagt gggggtgcag gcgggcagca ctgagggacc ctgccccgcc	2886
cctcccccca ggcccccttc cctgcagct tctcaagtga gactgacctg tctcaccag	2946
cagccactgc ccagccgcac tccaggcaag ggccagtgcg cctgctcctg accactgcaa	3006
tcccagcgcc caaggaaggc cacttctcaa ctggcagaac tctgaagtt tagaattgga	3066
attacttcct tactagtgtc ttttggctta aattttgtct ttgaagttg aatgcttaat	3126
cccgggaaag aggaacagga gtgccagact cctggctctt ccagtttaga aaaggctctg	3186

tgccaaggag ggaccacagg agctgggacc tgcctgcccc tgccttttcc ccttggtttt 3246
 gtgttacaag agttgttggg gacagtttca gatgattatt taatttgtaa atattgtaca 3306
 aattttaata gcttaaattg tatatacagc caaataaaaa ctgcattaa caaaaaaaaa 3366
 aaaaaaaaa 3374

<210> 2
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Phe Arg Thr Ala Val Met Met Ala Ala Ser Leu Ala Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Val Val Ala His Ala Tyr Tyr Leu Lys His Gln Phe Tyr Pro Thr
 20 25 30

Val Val Tyr Leu Thr Lys Ser Ser Pro Ser Met Ala Val Leu Tyr Ile
 35 40 45

Gln Ala Phe Val Leu Val Phe Leu Leu Gly Lys Val Met Gly Lys Val
 50 55 60

Phe Phe Gly Gln Leu Arg Ala Ala Glu Met Glu His Leu Leu Glu Arg
 65 70 75 80

Ser Trp Tyr Ala Val Thr Glu Thr Cys Leu Ala Phe Thr Val Phe Arg
 85 90 95

Asp Asp Phe Ser Pro Arg Phe Val Ala Leu Phe Thr Leu Leu Leu Phe
100 105 110

Leu Lys Cys Phe His Trp Leu Ala Glu Asp Arg Val Asp Phe Met Glu
115 120 125

Arg Ser Pro Asn Ile Ser Trp Leu Phe His Cys Arg Ile Val Ser Leu
130 135 140

Met Phe Leu Leu Gly Ile Leu Asp Phe Leu Phe Val Ser His Ala Tyr
145 150 155 160

His Ser Ile Leu Thr Arg Gly Ala Ser Val Gln Leu Val Phe Gly Phe
165 170 175

Glu Tyr Ala Ile Leu Met Thr Met Val Leu Thr Ile Phe Ile Lys Tyr
180 185 190

Val Leu His Ser Val Asp Leu Gln Ser Glu Asn Pro Trp Asp Asn Lys
195 200 205

Ala Val Tyr Met Leu Tyr Thr Glu Leu Phe Thr Gly Phe Ile Lys Val
210 215 220

Leu Leu Tyr Met Ala Phe Met Thr Ile Met Ile Lys Val His Thr Phe
225 230 235 240

Pro Leu Phe Ala Ile Arg Pro Met Tyr Leu Ala Met Arg Gln Phe Lys
245 250 255

Lys Ala Val Thr Asp Ala Ile Met Ser Arg Arg Ala Ile Arg Asn Met
260 265 270

Asn Thr Leu Tyr Pro Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Gln Ala Met Asp
275 280 285

Asn Val Cys Ile Ile Cys Arg Glu Glu Met Val Thr Gly Ala Lys Arg
290 295 300

Leu Pro Cys Asn His Ile Phe His Thr Ser Cys Leu Arg Ser Trp Phe
305 310 315 320

Gln Arg Gln Gln Thr Cys Pro Thr Cys Arg Met Asp Val Leu Arg Ala
325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gln Ser Pro Pro Pro Pro Glu Pro Ala Asp Gln Gly
340 345 350

Pro Pro Pro Ala Pro His Pro Pro Pro Leu Leu Pro Gln Pro Pro Asn
355 360 365

Phe Pro Gln Gly Leu Leu Pro Pro Phe Pro Pro Gly Met Phe Pro Leu
370 375 380

Trp Pro Pro Met Gly Pro Phe Pro Pro Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser
385 390 395 400

Gly Glu Ala Val Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Ala Ala Leu Ser Arg
405 410 415

Pro Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ala
420 425 430

Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Pro Gly Ser Gly Ser Ala Pro Glu Ala
435 440 445

Gly Pro Ala Pro Gly Phe Pro Phe Pro Pro Pro Trp Met Gly Met Pro
450 455 460

Leu Pro Pro Pro Phe Ala Phe Pro Pro Met Pro Val Pro Pro Ala Gly
465 470 475 480

Phe Ala Gly Leu Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Leu Glu Gly His Glu
485 490 495

Arg Gln His Leu Glu Ala Arg Leu Gln Ser Leu Arg Asn Ile His Thr
500 505 510

Leu Leu Asp Ala Ala Met Leu Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Thr Val Leu
515 520 525

Ala Ser Leu Gly Pro Pro Arg Pro Ala Thr Ser Val Asn Ser Thr Glu
530 535 540

Gly Thr Ala Thr Thr Val Val Ala Ala Ala Ser Ser Thr Ser Ile Pro
545 550 555 560

Ser Ser Glu Ala Thr Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Pro Pro Ala Pro
565 570 575

Glu Met Glu Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ser Val Gly Thr Glu Glu Met
580 585 590

Pro Glu Asp Gly Glu Pro Asp Ala Ala Glu Leu Arg Arg Arg Arg Leu
595 600 605

Gln Lys Leu Glu Ser Pro Val Ala His
610 615

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
aatgtctgca tcattgccc aga

23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
aagctgtgac agatgccatc atg

23

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
aaagctgtga cagatgccat cat

23

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
aagaaagctg tgacagatgc cat

23

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
aaggttctgc tgtacatggc ctt

23

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
aacaaggctg tgtacatgct cta

23

<210> 9
<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aaatgtttcc actggctggc tga

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

aagggtttct ttgggcaact gag

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aacatccaca cactgctgga cgc

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aacaccctgt atccagatgc cac

23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aaggtgcaca ccttcccact ctt

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

aatgtttcca ctggctggct gag

23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aagagactgc cctgcaacca cat

23

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

aacgttcctg gtacgccgct aca

23

<210> 17

<211> 1865

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (99).. (1274)

<223>

<400> 17

agagacgtga actgtcgttg cagagattgc gggcggctga gacgccgcct gcctggcacc 60

taggagcgca gcggagcccc gacaccgccg ccgccgcc atg gag tcc gag acc gaa 116

Met Glu Ser Glu Thr Glu

1

5

ccc gag ccc gtc acg ctc ctg gtg aag agc ccc aac cag cgc cac cgc 164

Pro Glu Pro Val Thr Leu Leu Val Lys Ser Pro Asn Gln Arg His Arg

10

15

20

gac ttg gag ctg agt ggc gac cgc ggc tgg agt gtg ggc cac ctc aag 212

Asp Leu Glu Leu Ser Gly Asp Arg Gly Trp Ser Val Gly His Leu Lys

25

30

35

gcc cac ctg agc cgc gtc tac ccc gag cgt ccg cgt cca gag gac cag 260

Ala His Leu Ser Arg Val Tyr Pro Glu Arg Pro Arg Pro Glu Asp Gln

40

45

50

agg tta att tat tct ggg aag ctg ttg ttg gat cac caa tgt ctc agg 308

Arg Leu Ile Tyr Ser Gly Lys Leu Leu Leu Asp His Gln Cys Leu Arg

55

60

65

70

gac ttg ctt cca aag cag gaa aaa cgg cat gtt ttg cat ctg gtg tgc 356

Asp Leu Leu Pro Lys Gln Glu Lys Arg His Val Leu His Leu Val Cys

75

80

85

aat gtg aag agt cct tca aaa atg cca gaa atc aac gcc aag gtg gct 404

Asn Val Lys Ser Pro Ser Lys Met Pro Glu Ile Asn Ala Lys Val Ala

90

95

100

gaa tcc aca gag gag cct gct ggt tct aat cgg gga cag tat cct gag 452

Glu Ser Thr Glu Glu Pro Ala Gly Ser Asn Arg Gly Gln Tyr Pro Glu

105

110

115

gat tcc tca agt gat ggt tta agg caa agg gaa gtt ctt cgg aac ctt	500
Asp Ser Ser Ser Asp Gly Leu Arg Gln Arg Glu Val Leu Arg Asn Leu	
120 125 130	
tct tcc cct gga tgg gaa aac atc tca agg cct gaa gct gcc cag cag	548
Ser Ser Pro Gly Trp Glu Asn Ile Ser Arg Pro Glu Ala Ala Gln Gln	
135 140 145 150	
gca ttc caa ggc ctg ggt cct ggt ttc tcc ggt tac aca ccc tat ggg	596
Ala Phe Gln Gly Leu Gly Pro Gly Phe Ser Gly Tyr Thr Pro Tyr Gly	
155 160 165	
tgg ctt cag ctt tcc tgg ttc cag cag ata tat gca cga cag tac tac	644
Trp Leu Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile Tyr Ala Arg Gln Tyr Tyr	
170 175 180	
atg caa tat tta gca gcc act gct gca tca ggg gct ttt gtt cca cca	692
Met Gln Tyr Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ser Gly Ala Phe Val Pro Pro	
185 190 195	
cca agt gca caa gag ata cct gtg gtc tct gca cct gct cca gcc cct	740
Pro Ser Ala Gln Glu Ile Pro Val Val Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro	
200 205 210	
att cac aac cag ttt cca gct gaa aac cag cct gcc aat cag aat gct	788
Ile His Asn Gln Phe Pro Ala Glu Asn Gln Pro Ala Asn Gln Asn Ala	
215 220 225 230	
gct cct caa gtg gtt gtt aat cct gga gcc aat caa aat ttg cgg atg	836
Ala Pro Gln Val Val Val Asn Pro Gly Ala Asn Gln Asn Leu Arg Met	
235 240 245	
aat gca caa ggt ggc cct att gtg gaa gaa gat gat gaa ata aat cga	884
Asn Ala Gln Gly Gly Pro Ile Val Glu Glu Asp Asp Glu Ile Asn Arg	
250 255 260	
gat tgg ttg gat tgg acc tat tca gca gct aca ttt tct gtt ttt ctc	932

Asp Trp Leu Asp Trp Thr Tyr Ser Ala Ala Thr Phe Ser Val Phe Leu	
265	270
275	
agt atc ctc tac ttc tac tcc tcc ctg agc aga ttc ctc atg gtc atg	980
Ser Ile Leu Tyr Phe Tyr Ser Ser Leu Ser Arg Phe Leu Met Val Met	
280	285
290	
ggg gcc acc gtt gtt atg tac ctg cat cac gtt ggg tgg ttt cca ttt	1028
Gly Ala Thr Val Val Met Tyr Leu His His Val Gly Trp Phe Pro Phe	
295	300
305	310
aga ccg agg ccg gtt cag aac ttc cca aat gat ggt cct cct cct gac	1076
Arg Pro Arg Pro Val Gln Asn Phe Pro Asn Asp Gly Pro Pro Pro Asp	
315	320
325	
gtt gta aat cag gac ccc aac aat aac tta cag gaa ggc act gat cct	1124
Val Val Asn Gln Asp Pro Asn Asn Asn Leu Gln Glu Gly Thr Asp Pro	
330	335
340	
gaa act gaa gac ccc aac cac ctc cct cca gac agg gat gta cta gat	1172
Glu Thr Glu Asp Pro Asn His Leu Pro Pro Asp Arg Asp Val Leu Asp	
345	350
355	
ggc gag cag acc agc ccc tcc ttt atg agc aca gca tgg ctt gtc ttc	1220
Gly Glu Gln Thr Ser Pro Ser Phe Met Ser Thr Ala Trp Leu Val Phe	
360	365
370	
aag act ttc ttt gcc tct ctt ctt cca gaa ggc ccc cca gcc atc gca	1268
Lys Thr Phe Phe Ala Ser Leu Leu Pro Glu Gly Pro Pro Ala Ile Ala	
375	380
385	390
aac tga tgggtgtttgt gctgtagctg ttggaggctt tgacaggaat ggactggatc	1324
Asn	
acctgactcc agctagattg cctctcctgg acatggcaat gatgagtttt taaaaaacag	1384
tgtggatgat gatatgcttt tgtgagcaag caaaagcaga aacgtgaagc cgtgatacaa	1444

attggatgaac aaaaaatgcc caaggcttct catgtcttta ttctgaagag cttaaataa 1504
 tactctatgt agtttaataa gcactgtacg tagaaggcct taggtgttgc atgtctatgc 1564
 ttgaggaact tttccaaatg tgtgtgtctg catgtgtgtt tgtacataga agtcatagat 1624
 gcagaagtgg ttctgtctgt acgatttgat tcctgttgga atgtttaaat tacactaagt 1684
 gtactacttt atataatcaa tgaaattgct agacatgttt tagcaggact ttcttaggaa 1744
 agacttatgt ataattgctt tttaaaatgc agtgcctttac tttaaactaa gggaacttt 1804
 gcggaggatga aaacctttgc tgggttttct gttcaataaa gttttactat gaatgaccct 1864
 g 1865

<210> 18

<211> 391

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Ser Glu Thr Glu Pro Glu Pro Val Thr Leu Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Pro Asn Gln Arg His Arg Asp Leu Glu Leu Ser Gly Asp Arg Gly Trp
 20 25 30

Ser Val Gly His Leu Lys Ala His Leu Ser Arg Val Tyr Pro Glu Arg
 35 40 45

Pro Arg Pro Glu Asp Gln Arg Leu Ile Tyr Ser Gly Lys Leu Leu Leu

50

55

60

Asp His Gln Cys Leu Arg Asp Leu Leu Pro Lys Gln Glu Lys Arg His
65 70 75 80

Val Leu His Leu Val Cys Asn Val Lys Ser Pro Ser Lys Met Pro Glu
85 90 95

Ile Asn Ala Lys Val Ala Glu Ser Thr Glu Glu Pro Ala Gly Ser Asn
100 105 110

Arg Gly Gln Tyr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Asp Gly Leu Arg Gln Arg
115 120 125

Glu Val Leu Arg Asn Leu Ser Ser Pro Gly Trp Glu Asn Ile Ser Arg
130 135 140

Pro Glu Ala Ala Gln Gln Ala Phe Gln Gly Leu Gly Pro Gly Phe Ser
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Pro Tyr Gly Trp Leu Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile
165 170 175

Tyr Ala Arg Gln Tyr Tyr Met Gln Tyr Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ser
180 185 190

Gly Ala Phe Val Pro Pro Pro Ser Ala Gln Glu Ile Pro Val Val Ser
195 200 205

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ile His Asn Gln Phe Pro Ala Glu Asn Gln
210 215 220

Pro Ala Asn Gln Asn Ala Ala Pro Gln Val Val Val Asn Pro Gly Ala
225 230 235 240

Asn Gln Asn Leu Arg Met Asn Ala Gln Gly Gly Pro Ile Val Glu Glu
245 250 255

Asp Asp Glu Ile Asn Arg Asp Trp Leu Asp Trp Thr Tyr Ser Ala Ala
260 265 270

Thr Phe Ser Val Phe Leu Ser Ile Leu Tyr Phe Tyr Ser Ser Leu Ser
275 280 285

Arg Phe Leu Met Val Met Gly Ala Thr Val Val Met Tyr Leu His His
290 295 300

Val Gly Trp Phe Pro Phe Arg Pro Arg Pro Val Gln Asn Phe Pro Asn
305 310 315 320

Asp Gly Pro Pro Pro Asp Val Val Asn Gln Asp Pro Asn Asn Asn Leu
325 330 335

Gln Glu Gly Thr Asp Pro Glu Thr Glu Asp Pro Asn His Leu Pro Pro
340 345 350

Asp Arg Asp Val Leu Asp Gly Glu Gln Thr Ser Pro Ser Phe Met Ser

355

360

365

Thr Ala Trp Leu Val Phe Lys Thr Phe Phe Ala Ser Leu Leu Pro Glu
370 375 380

Gly Pro Pro Ala Ile Ala Asn
385 390

<210> 19
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gly Tyr Thr Pro Tyr Gly Trp Leu Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Ile
1 5 10 15

Tyr Ala Arg Gln Tyr Tyr Met Gln Tyr Leu Ala Ala Thr Ala Ala Ser
20 25 30

Gly Ala Phe Val Pro Pro Pro Ser
35 40

<210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Leu Lys Ala His Leu Ser Arg Val Tyr Pro Glu Arg Pro Arg

1

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P25/00, 25/28, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P25/00, 25/28, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2003/070895 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INC.), 28 August, 2003 (28.08.03), Particularly, Claims; examples & EP 1423404 A2 & US 2003/190335 A1 & GB 23296155 A	1, 2 3-11
X A	JP 2003-289881 A (Director of Chubu National Hospital), 14 October, 2003 (14.10.03), Particularly, Claims; examples & WO 2003/012141 A1	1, 2 3-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 January, 2005 (14.01.05)

Date of mailing of the international search report
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015950

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2003/024485 A1 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 March, 2003 (27.03.03), Particularly, Claims; examples (Family: none)	1, 2 3-11
X A	WO 2003/057165 A2 (THE POCKEFELLER UNIVERSITY), 17 July, 2003 (17.07.03), Particularly, Claims; examples & US 2004/0028673 A1 & EP 1469810 A2	1, 2 3-11
X A	JP 2003-525947 A (MERCK SHARP & DOHME LTD.), 02 September, 2003 (02.09.03), Particularly, Claims; examples & WO 2001/066564 A2 & EP 1263774 A1 & US 2003/0055005 A1	1, 2 3-11
X A	JP 2002-322198 A (Pfizer Products Inc.), 08 November, 2002 (08.11.02), Particularly, Claims; page 2, left column, lines 13 to 21; examples & EP 1233021 A2 & US 2002/0115616 A1	1, 2 3-11
X A	JP 2002-173448 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 21 June, 2002 (21.06.02), Particularly, Claims; examples (Family: none)	1, 2 3-11
A	WO 2002/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), (Family: none)	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015950

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 11 relate to a medicinal composition containing a substance inhibiting secretase activity. In contrast, the inventions according to claims 12, 13 and 16 relate to a method of inhibiting secretase activity characterized by comprising promoting the sensitivity of a secretase inhibitor, and the inventions according to claims 14 to 16 relate to a method of inhibiting secretase activity characterized by comprising binding synoviolin to Herp. However, both of the method of inhibiting secretase activity characterized by comprising promoting the sensitivity of a secretase inhibitor and the method of inhibiting secretase activity characterized by comprising binding synoviolin (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1 to 11

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015950

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

to Herp cannot be considered as methods specifically applied to the production of the a medicinal composition containing a substance inhibiting secretase activity. Thus, there is no matter common to them which is seemingly a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2 and no technical relationship in the meaning within PCT Rule 13 can be found out among these inventions differing from each other. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features and, therefore, they are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

<Subject of search>

Claims 1 to 7 relate to a medicinal composition containing a substance defined as a desired property "a substance inhibiting secretase activity" as the active ingredient. Claims 5 to 7 relate to a composition containing, as the active ingredient, siRNA or shRNA being "siRNA or shRNA to a gene encoding synoviolin" and defined by a desired property "a synoviolin expression inhibitor". Although claims 1 to 7 involve any compounds having such a property, it is recognized that only part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of compounds having the property "a substance inhibiting secretase activity" cannot be specified. Thus, claims 1 to 7 do not comply with the requirement of clearness under PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made on the relation ship among the treatment of Alzheimer's disease, the inhibition of secretase activity and synoviolin, and remedies for Alzheimer's disease comprising the compounds as specified in claims 8 and 9 as the active ingredient. Complete search was made on claims 8 and 9.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P25/00, 25/28, 43/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P25/00, 25/28, 43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 2003/070895 A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS, INC), 2003. 08. 28, 特に、特許請求 の範囲及び実施例 & EP 1423404 A2 & US 2003/190635 A1 & GB 23296155 A	1, 2 3-11
X A	JP 2003-289881 A (国立療養所中部病院長等), 2003. 10. 14, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & WO 2003/012141 A1	1, 2 3-11
X	WO 2003/024485 A1 (小野薬品工業株式会社),	1, 2
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 14. 01. 2005		国際調査報告の発送日 01.02.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 のぶよ 電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	2003. 03. 27, 特に、特許請求の範囲及び実施例 (ファミリーなし)	3-11
X A	WO 2003/057165 A2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY), 2003. 07. 17, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & US 2004/0028673 A1 & EP 1469810 A2	1, 2 3-11
X A	JP 2003-525947 A (メルク シャープ ドーム リミテッド), 2003. 09. 02, 特に、特許請求の範囲及び実施例 & WO 2001/066564 A2 & EP 1263774 A1 & US 2003/0055005 A1	1, 2 3-11
X A	JP 2002-322198 A (ファイザー・プロダクツ・インク), 2002. 11. 08, 特に、特許請求の範囲、第2頁左欄第13~21行及び実施例 & EP 1233021 A2 & US 2002/0115616 A1	1, 2 3-11
X A	JP 2002-173448 A (住友製薬株式会社), 2002. 06. 21, 特に特許請求の範囲及び実施例 (ファミリーなし)	1, 2 3-11
A	WO 2002/052007 A1 (株式会社ロコモジェン), 2002. 07. 04 (ファミリーなし)	1-11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項1-11に係る発明は、セレクターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物であるのに対し、請求項12-13、16に係る発明は、セレクターゼ阻害剤の感受性を促進することを特徴とするセレクターゼ活性を抑制する方法、請求項14-16に係る発明は、シノピオリンをHerpと結合させることを特徴とするセレクターゼ活性を抑制する方法である。しかしながら、セレクターゼ阻害剤の感受性を促進することを特徴とするセレクターゼ活性を抑制する方法、並びに、シノピオリンをHerpと結合させることを特徴とするセレクターゼ活性を抑制する方法は、いずれもセレクターゼ活性を抑制する物質を含む医薬組成物の製造のために特に適用した方法とは認められないから、PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる共通の事項が存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。よって、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-11

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1-7は、「セクターゼ活性を抑制する物質」という所望の性質により定義された化合物を有効成分とする医薬組成物に関するものである。また、請求の範囲5-7は、「シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA または shRNA」であり、

「シノビオリンの発現抑制物質」という所望の性質により定義された siRNA または shRNA を含有する組成物に関するものである。そして、請求の範囲1-7は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「セクターゼ活性を抑制する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1-7は、PCT 6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、アルツハイマー病の治療とセクターゼ活性の抑制、シノビオリンとの関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲8, 9に特定されている化合物を有効成分とするアルツハイマー病治療剤について行った。また、請求の範囲8, 9については、完全な調査を行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.